

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-228442

(43)Date of publication of application : 24.08.1999

(51)Int.Cl.

A61K 38/00
A61K 31/70
// C07H 11/04

(21)Application number : 10-027047

(71)Applicant : CYPROS PHARMACEUT CORP

(22)Date of filing : 09.02.1998

(72)Inventor : ANGEL K MARKOV

(54) USE OF FRUCTOSE DIPHOSPHATE FOR REDUCING CYCLOSPORIN DOSE AFTER ORGAN TRANSPLANTATION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To effectively suppressing allograft rejection in a recipient of an implant, further interdependently enhancing immunodepression effect and reduce a cyclosporin dose after an organ transplantation by using fructose diphosphate.

SOLUTION: (A) A cyclosporin compound in an amount of an effective for suppressing a T-type lymphocyte activating response after organ transplantation operation and pharmaceutically permissible dose and (B) fructose-1,6-diphosphate in an amount of interdependently acting with the cyclosporin compound and thereby reducing a dose of the cyclosporin compound requiring for effectively suppressing a T-type lymphocyte activating response after an organ transplantation operation are administrated. Preferably, a method for administrating fructose-1,6-diphosphate to a patient by phlebotoclysis after the organ transplantation operation is exemplified as an administration method.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-228442

(43) 公開日 平成11年(1999) 8月24日

(51) Int.Cl. ⁹	識別記号	F I
A 6 1 K 38/00	AGA	A 6 1 K 37/02
31/70	ABC	31/70
// C 0 7 H 11/04		C 0 7 H 11/04

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願平10-27047	(71) 出願人	597019458 サイプロス・ファーマシューティカル・コーポレーション Cypros Pharmaceutical Corporation アメリカ合衆国92008カリフォルニア州カールスバッド、ロッカー・アベニュー・ウエスト2714番
(22) 出願日	平成10年(1998) 2月9日	(72) 発明者	エンジェル・ケイ・マーコフ アメリカ合衆国39206ミシシッピ州ジャクソン、ハンギング・モス・ロード5973番
		(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)

(54) 【発明の名称】 臓器移植後のシクロスポリン投与量を低減するためのフルクトースニリン酸の使用

(57) 【要約】

【課題】 移植組織のレシピエントにおける同種移植片拒絶反応を効果的に抑制し、さらに、従来の免疫抑制剤の持つ不利点を補助して、相互依存的に免疫抑制効果を高める。

【解決手段】 臓器移植手術後のT型リンパ球細胞活性化応答を抑制するのに有効な薬学的に許容し得る投与量のシクロスポリン化合物、およびシクロスポリン化合物と相互依存的に作用し、それによって、臓器移植手術後にT型リンパ球細胞活性化応答を効果的に抑制するのに必要とされるシクロスポリン化合物の投与量を低減する、薬学的に許容し得る投与量のフルクトース-1, 6-ニリン酸を投与する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 臓器移植手術後のT型リンパ球細胞活性化応答を抑制するのに有効な薬学的に許容し得る投与量のシクロスポリン化合物；および、

(b) シクロスポリン化合物と相互依存的に作用し、それによって、臓器移植手術後にT型リンパ球細胞活性化応答を効果的に抑制するのに必要とされるシクロスポリン化合物の投与量を低減する、薬学的に許容し得る投与量のフルクトース-1, 6-ニリン酸の投与を含んでなる、移植組織のレシピエントにおける同種移植片拒絶反応を抑制する方法。

【請求項2】 臓器移植手術後、フルクトース-1, 6-ニリン酸を静脈注入により患者に投与する、請求項1記載の方法。

【請求項3】 移植組織の哺乳動物レシピエントに、

(a) フルクトース-1, 6-ニリン酸、および、

(b) 活性化T細胞の増殖を抑制する既知の免疫抑制剤であるシクロスポリン化合物の組み合わせを投与することを含んでなる、移植組織のレシピエントにおける同種移植片拒絶反応を抑制する方法であって、

フルクトース-1, 6-ニリン酸をシクロスポリン化合物の免疫抑制活性を相互依存的に増大する薬学的に許容し得る投与量で投与し、それによって、より低投与量のシクロスポリン化合物の使用を可能にして、シクロスポリン化合物の毒性副作用を低減しながら有効な免疫抑制結果を提供する、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、心臓および腎臓などの内部臓器の保存および移植における、天然の哺乳動物代謝物であるフルクトース-1, 6-ニリン酸の使用に関する。

【0002】フルクトース-1, 6-ニリン酸は、解糖の代謝プロセス（グルコースの酸化により細胞内部でエネルギーを生産するプロセス）において産生され、次いで消費される中間化合物の1種である。要約すると、酸素およびアデノシン三リン酸（ATP）が十分に供給される条件下で、グルコースは酵素ヘキソキナーゼによりグルコース-6-リン酸へとリン酸化される。このリン酸化段階は、アデノシン三リン酸（ATP）分子からホスフェート基1つを取り、ATP分子をアデノシン二リン酸（ADP）へと変換する。第2段階で、グルコース-6-リン酸は、酵素ホスホグルコースイソメラーゼによりピラノース6員環構造（またはその互変異性体のアルドース直鎖）からフラノース5員環構造（またはその互変異性体のケトース直鎖）へと変換される。第3段階で、第2のホスフェート基が別のATP分子から取られ、酵素ホスホフルクトキナーゼ（PFKと略す）により1番目の炭素原子と結合して、フルクトース-1, 6-ニリン酸（以下FDPと略す）を生じる。

【0003】FDPを基質として用い、プロセス中でそれを消費する次の段階では、FDP分子（炭素原子6つを有する）が、酵素アルドラーゼにより触媒される反応において、それぞれ炭素原子3つを有する2つの小分子（グリセルアルデヒドとジヒドロキシアセトン）へと分解される。

【0004】好氣的解糖および嫌氣的解糖におけるこれらの反応およびその他様々な段階は、生化学または生理学のほとんどの教科書に記載されている。例えば、L. St. ryer, Biochemistry, pp. 260-261（第2版、1981）またはA. C. Guyton, Medical Physiology, pp. 841-842（第6版、1981）参照。

【0005】細胞から十分な酸素またはATPを奪うと、解糖経路は相対的に効率のよい好氣的解糖プロセスを維持できず、嫌氣的解糖状態へと切換わって、乳酸の生成およびアシドーシスと呼ばれる状態を導く。嫌氣的解糖は、好氣的解糖ほど効率的でもなく、また望まれるものでもない。これは、さまざまなタイプのストレス状態に反応して、例えば（比較的穏やかな形態では）運動中の運動選手の筋肉において起こり得る。また、虚血（即ち、脳卒中、心臓発作、心停止等の際に起こるような不十分な血流）状態またはその他の低酸素症形態（即ち、虚血およびその他、窒息、仮死、一酸化炭素中毒などの様々な症状の際に起こる不十分な酸素供給）の下、非常に深刻な形態で起こることもある。

【0006】嫌氣的解糖は、好氣的解糖ほど望まれるものではなく、また効率的でもないが、少なくとも若干のATP分子を生産するため、虚血/低酸素症状態下では生命維持に必要かつ重要なバックアップシステムとなり得る。FDPの各分子は、嫌氣的解糖の際に、貧エネルギーADPの4分子が富エネルギーATPへ変換するのに貢献する。

【0007】これまでに、出願人はFDPが様々な医学的症状を処置するのに使用できることを示してきた。米国特許第4, 546, 095号において、本発明者がFDPは心筋梗塞（即ち、心臓発作またはその他ある種の症状の際に心臓筋肉に起こる永久的組織損傷）を低減できることを開示した。米国特許第4, 703, 040号において、本発明者は、FDPが成人呼吸窮迫症候群（ARDS）罹病哺乳動物を処置するのに使用できることを開示した。更に、本発明者は、米国特許第4, 757, 052号において、FDPが血液貯蔵の際の保存に有利に使用できることを開示した。

【0008】これらの先行特許は全て、FDP注射が、ある種の“問題点”を効果的に回避し、酸素渴望細胞へ大いに必要とされるエネルギーを供給することにより、様々な症状の緩和に役立つことを示した。インシュリンおよびエネルギーを要求する機構を用いて細胞内部へと輸送しなければならないグルコース分子とは異なり、FDPはエネルギー依存的輸送機構を必要とせず、細胞へ

と直接浸透できる。更に、外来FDPの直接注入により、解糖経路はフルクトースリン酸からフルクトース二リン酸への反応を触媒する酵素PFKを迂回できる。酵素PFKは、乳酸アシドーシス状態で、その触媒能力を乱しまたは減じることがあり、この酵素の不活性化によりFDPの生産が妨げられる。このような問題をかかえた患者の血流へのFDPの注射は、これら2つの問題点（細胞輸送問題およびPFK問題）を回避でき、よって、解糖経路を補充して好ましい好氣的解糖形態を回復できるまで、渴望細胞が嫌氣的解糖による限られた形態の代謝を維持できるようにする富エネルギー代謝物を渴望細胞へと提供するものである。また、この系に基質として外来FDPを与えることが、酵素PFKのあらゆる異常を低減または逆転するのに役立ち得ることも明らかであり、これは、酵素PFKを活性化状態へと回復させる助けとなり、酵素PFKは再び解糖経路に参入できるようになる。

【0009】本発明は、新たな発見を含むが、これは、前記に開示したようにFDPにより処置できる虚血、低酸素症またはその他有害症状に関する従来技術には直接的に関連しない。

【0010】解糖経路を補充する以外にも、FDPは、別の手段で移植臓器（例えば、腎臓、心臓等）のレシピエントにおける内部臓器の拒絶を悪化させる様々な細胞反応を低減および制御することが最近見いだされた。これには様々な機構が絡み合っているようであり、特に、FDPは、臓器拒絶の問題に寄与し、これを悪化させるあるタイプの刺激化リンパ球の増殖を低減させることができる。

【0011】次の段落に、移植臓器の拒絶にからむ細胞およびプロセスに関する更なる背景情報を記載する。

【0012】

【従来技術および発明が解決しようとする課題】臓器拒絶；刺激化Tリンパ球

細胞膜の重要な機能は、各細胞に特異的な化学基からなる、通常、組織適合性または移植抗原として知られている“IDカード”を与えることである。多くの移植抗原が同定されており、それらの多形性は、2個体が同一の組み合わせを有する可能性が同一の双生子を除き事実上ゼロであるようなものである。移植抗原は、生物体侵入者として処理されるあらゆる“非自己”細胞表面上の化学基を認識する能力を有するリンパ球により継続的に調査されている。

【0013】リンパ球の2つの主要タイプはB細胞とT細胞に分類されており、これらは、T細胞が胸腺にて前処理されること、またB細胞が最初に鳥類のいわゆる“ファブリーキウス嚢”にて前処理されるものとして同定されたことから、この名称がついた。一般的に、Bリンパ球は、その標的の表面にて抗原と特異的に結合する抗体を産生することにより拒絶プロセスに携わる。B細胞

により産生されたこれらの抗体は、自分自身を殺すことではないが、その代わり、標的細胞を死滅させる多形核白血球などの他の細胞に対する認識装置（マーカー）として働く。抗体もまた、活性化酵素を使用して抗体標識細胞を攻撃し、死滅させる“完全な”システムを活性化する。

【0014】B細胞とは反対に、T細胞は直接接触機構を経て、非自己細胞の表面にて抗原に結合し、次いで、細胞毒性物質を侵入細胞へ放出したり、侵入部位に移動して非自己細胞を貪食し消化するマクロファージ細胞を誘引し、かつ活性化する物質を放出するなどの様々なプロセスを実施して、非自己細胞を攻撃する。

【0015】B細胞とT細胞のこの他の相異点は、B細胞は“体液性”免疫に関わると言われるのに対し、T細胞は“細胞性”免疫に関わると言われることである。一般的に、体液性（B細胞）免疫はより迅速で、その効果は長くは続かない傾向にあり、普通、多くの細菌感染を防御するという主な役割を果たす。反対に、細胞性（T細胞）免疫はよりゆっくりと進行する感染（結核など）を防御し、癌を防ぎ、移植臓器の外来細胞を攻撃するという主な役割を果たすことが多い。

【0016】免疫応答および臓器拒絶のB細胞、T細胞およびその他の態様に関わるプロセスは、多くの教科書に記載されており、例えば、GuytonのMedical Physiology（上記引用）の74-81頁に有用な概観が与えられている。

【0017】臓器移植に応答して拒絶が起こるとき、そのプロセスは“同種移植片”拒絶と呼ばれる。この拒絶反応は、移植外科医の最も頭を悩ますところであり、いかに外科手術が成功したとしても、あるいは、組織適合性がいかに親密であり得るとしても、同種移植片拒絶は患者にとって冷酷かつ一生の脅威である。

【0018】この拒絶応答において非常重要的な段階は、活性化T細胞（刺激化T細胞または感作化T細胞とも呼ばれる）に、細胞表面上に1またはそれ以上の非自己抗原を有する細胞を認識させて攻撃させるというT細胞の活性化に関係するものである。活性化シグナルは、非自己抗原とT細胞表面受容体との反応に関わると考えられており、この受容体は、恐らく、T細胞の膜にまたがる糖タンパク質分子である。T細胞が活性化シグナルに回答する分子機構については比較的知られていないか、あるいは、リンパ芽球（成熟分化リンパ球を生じる未熟リンパ球細胞）の形質転換および増殖に関するある種の形態学的変化をもたらす一連の事象が知られているとしても、この形質転換を受けるT細胞のエネルギーおよびエントロピー状態についてはほとんど知られていない。広範囲の研究が科学および医学文献に公表されているにもかかわらず、かかるパラメーターやどのようにしてまたはなぜそれらがT細胞活性化後に変化するのかについてはほとんど知られていない。

【0019】免疫抑制剤

拒絶反応を軽減するために、外科医は免疫抑制剤を使用して臓器レシピエントにおける免疫応答を抑制する。理想的には、完全な免疫抑制剤とは、同種移植片拒絶強度を下げるが、患者が細菌感染、ウイルス感染および他の感染に抵抗できるように必要なその他の形態の免疫応答には変化を与えないようなものである。

【0020】現在のところ、このような理想的な免疫抑制剤は入手できない。現在使用されている殆どの免疫抑制剤は、細菌またはウイルス感染に対する身体の抵抗力を下げ、他の不要な副作用まで同時に起こしてしまう。これらの薬剤は、高用量で使用すると免疫細胞およびその他多種の細胞に対して有毒であり、より低用量であれば、移植臓器の拒絶を防止する効果が低下するか、または全く効果がなくなることさえある。

【0021】要約すると、免疫抑制剤には次の4つのグループがある：アルキル化剤、代謝拮抗物質（葉酸またはピリミジンおよびプリン類似体など）、ステロイドおよび抗生物質。

【0022】最も有望な、広範囲に使用される免疫抑制剤は、シクロスポリンA（CSAと略す）であり、これはB細胞活性に抵触することなく抗原刺激化Tリンパ球を抑制する特異的作用を有する。CSAが免疫抑制剤として導入されたことから、臓器移植手術の成功率は上がり、何千人もの患者の命を延ばすのに使用されてきた。

【0023】しかしながら、CSAは免疫抑制剤として望まれる多くのことを残している。その主たる有害事項の1つが腎臓に関するものであり、この薬剤で処置した同種移植片レシピエントの20-25%で腎臓中毒が起こる。腎臓中毒は用量に関連し、時折可逆的であるが、CSAの中断、投与量の低減またはその他治療法の変更を要することも多い。高血圧も主要な問題であり、腎移植片（腎臓）、肝移植片（肝臓）または心移植片（心臓）を受けた患者およびCSAで処置された患者の約30%で起こる。神経学的CSA中毒も、特に、肝臓移植物を有する患者には普通に起こる。

【0024】FDPが単独で臓器拒絶を低減するのに役立ち得ることを開示した以外に、本発明は、FDPがシクロスポリンの効果を相互依存的に増大（強化）する移植物保護免疫抑制剤として作用することも開示する。従って、FDPはCSA療法の際のCSA投与量を低減する補助剤として使用でき、そうしてCSA処置の有毒な副作用およびその他の危険性の見込みおよび深刻さを低減できる。

【0025】多くの薬剤（狭心症の痛みを制御したり、血圧を下げるのに使用される2種の血管拡張薬であるニカルジピンおよびジルチアゼムなどのある種のカルシウムチャンネル遮断剤を含む）が移植片レシピエントの血液中を循環するCSAのレベルを上げるために広く使用されていることに注目すべきである。これにより、内科

医は所望のCSA血中レベルを達成しつつ、より低用量のCSAを投与できる。FDPの働きがこの機構による（即ち、血中のCSAレベルを上げることによる）とは考えられず、下記に与えたインビトロデータがFDPは、CSAの血中濃度を上げる代わりに、CSAの血中濃度がどうであろうとT細胞制御効果を高めるらしいという、全く異なる機構により働くことを示している。

【0026】更に、FDPは、移植、摘出段階、貯蔵および内移植の際に臓器が被る損傷の量もまた低減できることが示されている。出願人は、これらの活性についてFDPのその他の有益な活性に基づき予め推測していたが、本出願人に付与された先行特許（上記引用）のいずれにも、これらの活性は記載も定量も特許請求もしていなかった。

【0027】

【課題を解決するための手段】従って、本発明の一つの目的は、移植臓器のレシピエントにおける内部臓器の拒絶に関わる様々な細胞反応を低減および制御するのに役立つFDPの利用法を開示することである。

【0028】本発明のもう一つの目的は、臓器移植における拒絶の問題に寄与するある種のリンパ球の不要な増殖を低減するのに役立つFDPの利用法を開示することである。

【0029】本発明のもう一つの目的は、臓器移植後のシクロスポリン療法の際の補助剤としてのFDPの利用法を開示することであり、これはシクロスポリンの所望の免疫抑制効果を強化することによって、CSA投与量を下げ、そうしてCSA処置の有毒な副作用およびその他の危険性の見込みおよび深刻さを低減できる。

【0030】本発明のもう一つの目的は、FDPは臓器移植の際に必要な摘出および貯蔵段階に臓器が被る損傷の量を低減することを開示することである。

【0031】本発明のこれらのおよびその他の目的は下記の発明の概要および詳細な説明において明らかとなるであろう。

【0032】発明の概要

本発明は、腎臓、心臓等の内部臓器の拒絶を抑制するのに役立つフルクトース-1,6-二リン酸の使用法を開示する。臓器移植物に関する少なくとも3つの主要な利点は以下のものと定義した：（1）FDPは、移植臓器において非自己細胞を攻撃する危険性を有するある種の刺激化リンパ球の不要な増殖を低減するのに役立ち得る；（2）FDPは、移植物保護免疫抑制剤としてのシクロスポリンの効果を強化することによって、CSA投与量を下げさせ、そうしてCSA処置の有毒な副作用およびその他の危険性の見込みおよび深刻さを低減することもできる；（3）FDPは、臓器移植時に必要な摘出および貯蔵段階の際に臓器に加えられる損傷の量を低減することもできる。

【0033】

【発明の実施の形態】本発明は、腎臓、心臓等の内部臓器の拒絶を抑制するのに役立つフルクトース-1, 6-ニリン酸の使用法を開示する。臓器移植に関する少なくとも3つの主要な利点は以下のものと定義した：(1) FDPは、移植臓器において非自己細胞を攻撃する危険性を有するある種の刺激化リンパ球の不要な増殖を低減するのに役立ち得る；(2) FDPは、移植物保護免疫抑制剤としてのシクロスポリンの効果を強化することによって、CSA投与量を下げさせ、そうしてCSA処置の有毒な副作用およびその他の危険性を見込みおよび深刻さを低減することもできる；(3) FDPは、臓器移植時に必要な摘出および貯蔵段階の際に臓器に加えられる損傷の量を低減することもできる。

【0034】本発明のこれらの態様は、それぞれ下記に述べる。

【0035】刺激化Tリンパ球におけるインビトロ試験既に述べたように、活性化T細胞（刺激化T細胞または感作化T細胞とも呼ばれる）は同種移植片拒絶において重要な役割を果たす。T細胞は移植臓器上の非自己抗原により刺激されると、外来臓器を拒絶するための攻撃を開始できる。

【0036】培養中のリンパ球ヘマイトジェンを添加すると30秒以内にカリウムイオン(K^+)およびナトリウムイオン(Na^+)の細胞膜通過輸送が非刺激化リンパ球に比べて倍増することが知られている。このイオン輸送システムは、ナトリウム-カリウムATPアーゼとして知られている酵素により制御されており、細胞内部にて（細胞外液と比べて）ナトリウムを低濃度に、カリウムを高濃度に保つ、生命維持に必須の重要な細胞機能である。刺激化リンパ球において、細胞膜のイオンポンプ活性の上昇は細胞にて生産される総エネルギーの約40%を消費する。これは並外れて高い割合であり、刺激化リンパ球におけるイオン輸送の増大の重要性はまだ理解されていないが、リンパ芽球形質転換の特性である細胞の体積調節を表すのかもしれないし、またはTリンパ球の活性化がcAMP濃度の上昇を要とすると考えられていることから、環状アデノシンリン酸(cAMP)の変化に関係するのかもしれない。ATPからcAMPへの変換を触媒する酵素であるアデニルシクラーゼと Na^+-K^+-ATP アーゼは、刺激化Tリンパ球における富

エネルギーATP供給のため、お互いに拮抗しなければならず、その刺激された活性レベルはかかる細胞におけるATP供給の比較的迅速な減少に寄与する。

【0037】FDPが虚血（無酸素症または低酸素症）組織における細胞の K^+ 損失およびの Na^+ 流入を妨げるのに役立つことが多くの研究で示されており、これは Na^+-K^+-ATP アーゼポンプがかかる条件下で適切に機能するための十分なATP濃度を維持するのに役立つことも示している。健常細胞では総細胞エネルギーのおよそ40%がイオン輸送に使用されるため、また、そのエネルギーの大部分が解糖によりサイトソル中で生産されるため、FDPの存在はATP産生を増大させるらしい。

【0038】これらの事実に気づく人ならば、FDPの添加が、刺激レベルを維持または高めるのに役立つように細胞が使用できる富エネルギー基質をリンパ球に提供することによって、Tリンパ球刺激レベルを高めると期待するであろう。この問題を調査し、かつ刺激プロセスにおける細胞のエントロピー状態を研究するために、出願人は、FDPの添加が実際に細胞の刺激レベルを高めるかどうかを測定する実験を行った。

【0039】しかしながら、その結果は、FDPの添加は細胞の刺激レベルを高めないことを示した。実際には、刺激活性を誘導するのに役立つように細胞が使用できる富エネルギー基質を提供するのではなく、外来FDPは、リンパ球刺激レベルを下げた。

【0040】インビトロ試験およびその結果は、実施例1に詳細に記載している。要約すると、まずTリンパ球をラット脾臓から入手した。次いで、この細胞を対照サンプルおよび様々な濃度でFDPまたはシクロスポリンのいずれかと接触させたサンプルの両方において、Tリンパ球複製を特異的に刺激するマイトジェンであるコンカナバリンA(ConA)により刺激した。細胞複製は、水素の重同位元素であるトリチウムを用いて放射性標識しておいたチミジンの取り込みを検定することにより測定した。細胞生存能は、色素トリパンブルーを用いて測定した。無傷の生存可能細胞はその内部からトリパンブルーを排除できるのに対し、損傷を受けた細胞または死細胞は排除できない。

【表1】

表1
コンカナバリンA刺激のTリンパ球によるチミジン取り込みに対するFDPの阻害作用

対照	FDP 1:10000	FDP 1:1000	FDP 1:500	FDP 1:250	FDP 1:100	FDP 1:10
166098	89032	62518	52481	24818	1175	136
±37.622	±17.953	±15.072	±19.287	±8889	±720	±37
有意性	N.S.	p<0.05	p<0.025	p<0.005	p<0.005	p<0.005

【表2】

表2

コンカナバリンA刺激のTリンパ球によるチミジン取り込みに対する
シクロスポリンA (CSA) の阻害作用

対照	CSA 0.5ng/ml	CSA 5ng/ml	CSA 50ng/ml	CSA 500ng/ml
166098	54841	32027	12956	294
±37.622	±9928	±4574	±6450	±165
有意性	N. S.	p<0.05	p<0.025	p<0.02

【表3】

表3

FDA処置およびCSA処置のラット脾臓Tリンパ球の生存率の比較
(48時間インキュベーション後)

	生存%	有意性
対照	83.6±4.12	
FDP-1:10000	83.3±4.28	N. S.
FDP-1:1000	81.6±4.14	N. S.
FDP-1:500	78.7±3.87	N. S.
FDP-1:250	75.7±4.5	N. S.
FDP-1:100	76.1±3.72	N. S.
FDP-1:10	65.3±5.0	p<0.02
CSA 0.5ng/ml	69.55±1.69	p<0.01
CSA 5ng/ml	62.11±2.74	p<0.001
CSA 50ng/ml	53.0±4.1	p<0.0005
CSA 500ng/ml	42.66±6.11	p<0.00001

【0041】表1および2の結果は、FDPがインビトロにおいてシクロスポリンと同程度にTリンパ球のマイトジェン刺激複製を抑制するのに効果的であることを示した。同時に、表3に示されているように、FDPは細胞生存能に対し低用量ではわずかな、また高用量では非常に穏やかな逆作用しか持たない。これに対し、シクロスポリンは、T細胞生存能に対し実質的に有毒な作用を有する。

【0042】これらの意外な結果は、FDPが、過剰なエネルギー源を提供するという事実にもかかわらず、実際にはT細胞刺激を増大するのではなくむしろ低下させることを示した。

【0043】移植心臓に対するインビボ試験
不要なT細胞刺激が同種移植片拒絶を引き起こす主たる要因であることが知られているため、FDPがT細胞刺激を抑制できることを示す上記インビトロ研究の結果から、ラットの心臓移植を用いる一連のインビボ試験を行うこととした。これらの試験は、実施例2に詳細に記載

している。要約すると、ルイスラットとして知られている種の実験用ラットをレシピエントとして用い、ウィスターファースとして知られている異種のラットを心臓ドナーとして使用した。

【0044】レシピエント動物において、その元の心臓を摘出し、新たな心臓を移植した。その代わり、ドナー動物由来の心臓を、心臓から血液をくみ出させるが移植心臓に血液ポンプ荷重を負わせないような方法でレシピエントの腹部に移植した。この動物モデルにより、体が外来組織を拒絶するかどうかを測定するのに適した試験を行うことができ、更に、動物の元の心臓を摘出する場合に起こる異常な困難性を避けることができる。

【0045】試験の第1ラウンドでは、4処置グループと1対照グループを設定した。対照グループにはFDPを与えなかった。4処置グループには、FDP 350mg/kg (即ち、体重1kg当たりFDP 350mg) を外科手術前15分に静脈注射した。処置動物には、更に手術中90分間、10mg/kg/分の速度でFDP注入した。

これらの“術中FDP”注射以外にも、4処置グループには更に以下のものを与えた：

グループ1：塩水を2時間術後注射。

グループ2：FDPを2時間術後注射し12時間毎に補足注射(350mg/kg)。

グループ3：2時間術後注射し、8時間毎に補足注射(350mg/kg)。

グループ4：2時間術後注射し、6時間毎に補足注射(350mg/kg)。

この試験の初期ラウンドは、長期間生存を評価するために意図または設定したものではなく、また、これらの動物にはいずれも全く抗生物質を与えなかった。

【0046】これらの動物は生存能について毎日試験した。移植心臓の心拍動が触診可能でなければ、動物に麻酔をかけて評価した。移植心臓が非生存能レベルに到達したら、致死量のペントバルビタールを与え、心臓を除

去し、顕微鏡検査し、スタンフォードグレード測定器を用いて拒絶について分類した。

【0047】術後3日前に移植心臓の心拍動が停止したら、その動物の研究は中断した。原因不明で手術5日以内に死亡したラットもまた研究を中断した。これらの死亡は、組織拒絶に起因するというよりもむしろ敗血症によるものであると考えられた。また、グループ1の1個体は、縫合骨折(suture fracture)により死亡し、この動物もまた研究を中断した。

【0048】この結果は、表4および5に示す。FDPを与えなかった対照グループでは、“平均生存期間”(MST)は7.6日であった。これらのラットは全て、移植心臓が拒絶されるまで生存し、その拒絶グレードは、中度から重度/進行段階の範囲であった。

【表4】

表4

移植片生存

試験グループ	数	期間	平均生存期間 MST±SE	有意性
対照	7	8, 7, 7, 8, 7, 8, 8	7.6±0.2020	
1	11	16, 10, 9, 25, 16, 15, 8, 12, 13, 13, 11	13.5±1.4101	p<0.005
2	8	7, 8, 10, 7, 9, 11, 9, 10	8.9±0.5154	p<0.05
3	8	9, 12, 11, 12, 9, 10, 9, 8	10.0±0.5345	p<0.005
4	8	10, 9, 14, 11, 8, 8, 8, 7	9.4±0.8004	p=0.06
1=手術前注射				
2=1日2回注射				
3=1日3回注射				
4=1日4回注射				

【表5】

表5

拒絶グレード

	数	軽度	中程度	重度/進行段階
対照	7		2	5
*1	11	1	1	8
2	8	1	1	6
3	8		1	7
4	8			8

*1心臓は不注意の処置のために評価せず

【0049】術後FDPを与えたが補足注射しなかった

グループ1のMSTは13.5日であった。このグルー

ブで残った個体は、拒絶が起こるまで生存し、軽度から重度／進行段階の拒絶グレードを有した。明らかに敗血症により死亡したラット1個体は、分類前にそのラットを不注意にも廃棄してしまったため拒絶を分類しなかった。

【0050】グループIIのMSTは8.9日であった。ラット1個体は9日目に明らかに敗血症で死亡した。その他のラットは全て、その移植片が拒絶されるまで生存し、軽度から重度／進行段階の拒絶グレードを有した。軽度の1個体は、明らかに敗血症で死亡した動物に属した。

【0051】グループIIIのMSTは10日であった。ラット1個体は12日目に敗血症で死亡し、深刻な敗血症の1個体は11日目の夕方に安楽死させたが、その移植片が安楽死させた夜、強力で触診可能であったため12日目の拒絶として計数した。このグループで残った個体は、拒絶が起こるまで生存し、中度から深刻／進行段階のグレードを有した。

【0052】グループIVのMSTは9.6日であった。このグループのラットは全て、その移植片が拒絶されるまで生存した。これらは全て、重度／進行段階の拒絶グレードを有した。

【0053】上記のとおり、これらの動物にはいずれも抗生物質を全く与えておらず、敗血症はこの実験に現れる難しい問題であった。計4匹の実験ラット(9.5%)は死亡したか、または敗血症のため安楽死させた。全てのラットに2種の別個の手術、頸動脈系を配置する手術と移植手術、を施した。次いで、ラットに連続中心カニューレ挿入し、注射を繰り返した。無菌法を用いたが、ラットがそのカテーテルを噛んだり、自分の糞の上を転げ回るので、この実験グループで無菌状態を確保するのは困難であった。しかしながら、こういった問題に

もかかわらず、これらの第1ラウンド試験は、FDPがラットの心臓移植生存力を延ばすことができることを示した。

【0054】インビゴ試験、系列2

インビゴ試験系列2では、FDP単独の場合とシクロスポリンと併用した場合に、同種移植片拒絶を抑制し、かつ移植心臓の生存力を延ばすその能力について試験した。シクロスポリンA(CSA)は、殆どの複合免疫抑制プロトコルの基礎となっているが、免疫抑制用量で固有の毒性を表す。そのため、これらの試験では、最適下限用量のCSAと併用した場合のFDPを評価した。

【0055】これらの試験では、上記と同じ操作を用いて心臓をレシピエント動物の腹部に移植した。最初の試験とは異なり、動物には、外科手術後に予防的抗生物質処置を施すのと同様に静脈カテーテル部位にバシトラシン軟膏を毎日塗布した。

【0056】動物は、次の6グループに分けた：グループI(n=6)にはFDPもCSAも与えない。グループII(n=5)には、FDPのみ350mg/kg静脈内(IV)を術前注射し、10mg/kg IVを90分間術前注入した。グループIII(n=6)には、最適下限用量のCSA2.5mg/kg/日筋肉内(IM)を与えた。グループIV(n=5)には、より高用量の、ただし依然最適下限用量のCSA(5mg/kg/日IM)を与えた。グループV(n=5)には、FDPを術前注射(350mg/kg IV)および90分間10mg/kg/分の術中注入、更にFDP(12時間毎に350mg/kg IV)および最適下限用量のCSA(2.5mg/kg/日IM)の両方を補足注射した。グループVI(n=5)には、グループ5のようなFDP処理をし、CSA用量を5mg/kg/日IMを増やした。

【表6】

表6

FDP単独、変化量のCSAおよびFDP/CSAの組み合わせを
投与したときのラット心臓移植の生存期間の比較

用量 mg/kg/日	数	生存期間 (日)	MST±SEM	有意性
対照 非処置	6	6, 7, 7, 7, 7, 8	7±0.25	
FDP手術前 および手術時	5	10, 10, 11, 12, 14	11.4±0.74	p<0.0001
CSA 2.5mg/kg/日	6	10, 11, 12, 12, 13, 14	12±0.58	p<0.0001
CSA 5mg/kg/日	5	10, 11, 13, 14, 14	12.4±0.81	p<0.0001
CSA 2.5mg/kg/日 FDP 700mg/kg/日	5	17, 17, 17, 18, 19	17.6±0.4	p<0.000001
CSA 5mg/kg/日 FDP 700mg/kg/日	5	26, 27, 27, 30, 31	28.2±0.96	p<0.0000001

【0057】この結果は、表6に示したように、FDPが単独で同種移植片生存力を顕著に延ばすことができることを指示している。FDPもCSAも与えない対照グループでは、平均生存時間（MST）の平均は7日であるのに対し、FDPのみを与えたグループでは、MSTは平均11.4日（統計学的確率 $p < 0.0001$ ）に上昇し、これはCSAを2.5mg/kg/日（MST12.0日）または5mg/kg/日（MST12.4日）与えた2グループのMSTに匹敵した。非常に重要ことに、FDPとCSAの組み合わせを与えたグループVとVIのデータが、17.6日（CSA 2.5mg/kg/日）および28.2日（CSA 5mg/kg/日）というMSTの同程度の上昇を示した。このことは、FDPとCSAの併用がCSAまたはFDPのいずれか単独の場合と比較して同種移植片生存力を顕著に増大させたことを指示している。

【0058】従って、2集のインビボ心臓移植試験から得られタデータは、（1）FDPが単独で同種移植片拒絶を抑制でき、同種移植片生存時間を増大でき、および（2）FDPがシクロスポリンの有用な免疫抑制作用を強化することもでき、それによって、シクロスポリンの有毒な副作用を回避または最少化するような方法でより低用量のシクロスポリンを使用可能にすることを示す。これらの特性はいずれも、移植レシピエントの長期間処置に非常に有用である。

【0059】臓器貯蔵中の組織および細胞損傷の低減臓器をレシピエント体内に移植後の同種移植片拒絶の問題を低減する以外に、本発明は、FDPを用いて、ドナーの体から摘出後、レシピエントへ移植するまでのいわゆる貯蔵期間中に臓器に与える損傷を最少化できること

も開示する。この貯蔵期間中、内部期間は普通、低体温状態（即ち、低温）に保たれている。37℃の正常体温以下の温度はいずれも、低体温と分類され、実際に、移植準備のできた臓器は、氷および海綿水を用いて凝固点よりも僅かに高い温度で冷蔵されて、細胞または臓器内部に氷結晶を生じることなく細胞代謝要求を最小化することが多い。

【0060】移植用臓器の遠隔調達が、臓器が体外にある間、臓器を保存するための理想的な方法および薬剤がないために、制限されている。理想的な調整培地および貯蔵培地が発見されていないため、殆どの臓器移植は摘出後数時間以内に実施されなければならない、多くの移植物は人力でできる限り貯蔵および輸送期間を縮めるために異例の措置（特にチャータージェット機輸送など）を要求する。免疫学的に適した臓器ドナーの不足が、遠隔調達および輸送を余儀なくすることも多く、輸送を必要としない場合でさえ、レシピエントと接触して手術準備ができるまである程度の時間が経過してしまうことが多い。このような理由で、貯蔵、輸送および移植中に集めた臓器が虚血およびその他の損傷を被むる程度を低減できる薬剤および方法の開発における更なる進歩が必要とされている。

【0061】集めた臓器組織の虚血損傷の主たる原因は、酸化的代謝の機能不全である。このような環境下では、好氣的解糖が迅速に消耗され、不十分な好氣的エネルギー生産を補うための作用として嫌氣的解糖が始まる。まず嫌氣的解糖の異化活性が増大した後、嫌氣的炭化水素利用は、嫌氣的解糖を実施するのに必要な酵素ホスホフルクトキナーゼ（PFK）の不活性化を含む多くの逆作用を有する乳酸の増大により比較的迅速に減退し

始める。

【0062】虚血臓器貯蔵中の酸化的代謝機能不全は、その機能不全はもちろん、更なる多種多様な問題も誘発する。その結果、虚血臓器貯蔵中および移植後に血流が回復した後に、所望の膜内外のイオン平衡の部分的または総合的損失、細胞からの酵素放出、高度に反応性かつ有害な酸化遊離ラジカルの産生、ミトコンドリア傷害、およびその他の逆作用にの一因となり得る。更に、低体温性虚血貯蔵の後には、貯蔵中および再循環後の Ca^{++} によるミトコンドリア傷害および酸化ラジカルの産生のため、酸素を適切に利用する臓器の能力が、貯蔵後に再循環する際、著しく衰える。これらの変化を担う機構が全て正確に顕示されているとは限らないが、2つの異なる別個の要因が損傷の一因となることに注目すべきである：(1) 貯蔵臓器中に虚血自身により引き起こされる損傷、および(2) 酸素化された血液での循環が回復した後に開始または現れるあるプロセスにより引き起こされる損傷。虚血低体温性貯蔵の際、代謝速度が大きく低下するにもかかわらず、更にあるレベルのATPの分解および損失があり、これが酵素 Na-K-ATPase がそのイオンポンプ機能を実施する能力を妨げる。このような膜内外のイオンポンプに必要とされるエネルギーの損失は、 K^+ の細胞内損失および Na^+ の細胞内流入を導き、その結果、細胞および臓器における浮腫(体液蓄積および膨張)および細胞および臓器への酵素放出および他の傷害を生じる。エキスピボ臓器貯蔵中のATPの分解はまた、移植後の血流回復の際、生体分子を無作為に攻撃し破壊する有毒な酸素遊離ラジカルを生成するキサンチンオキシダーゼ経路の基質を提供する代謝物を生成するため、移植臓器組織への更なる傷害を引き起こす。虚血的に貯蔵された臓器における酸化ラジカル損傷および他形態の傷害の程度は、虚血傷害の性質および深刻さ(即ち、どれほど長く臓器を貯蔵したか)および臓器の中を再循環する血液中の食細胞的な細胞要素の存在によって変わるようである。多形核好中球(PMN)と呼ばれる細胞が臓器の虚血後再循環において更なる組織傷害を生むことを示唆する実験および臨床証拠がある。一旦活性化されると、PMNは、ペントースホスフェート経路を介する酸素消費の増大を特徴とする“レスピラトリバースト”を受ける。この経路は、細胞および臓器に更なる傷害を引き起こす細胞毒性酸素種を産生し得る。

【0063】実施例4および5に記載するように、出願人は、外来FDPがこれらの問題を軽減できることを示している。FDPは次の少なくとも2つの異なる有益な効果を与える：(1) 酵素の乳酸不活性化を逆行することにより、酵素PFKの活性を刺激するのに役立つ、および(2) 酵素PFKの下流で解糖経路を供給する高エネルギー基質を直接提供できる。これらの要因はいずれも虚血的に貯蔵されている臓器の細胞への富エネルギー

ATPの解糖的供給を延長および増大するのに役立つため、このような介入は、臓器の体外貯蔵に際する組織損傷を減弱できる。

【0064】図1～5(実施例4)に示したように、FDP処置は、4時間冷却虚血エキスピボ貯蔵した灌流化心臓における機械的機能(心拍動速度、収縮期大動脈血圧、平均血圧および出力速度)および心筋ATP含量の実質的な増大を導く。

【0065】更に、実施例5に記載のように、虚血的に貯蔵した肝臓、腎臓および心臓のFDP処置もまた、貯蔵後有意により多量の酸素が利用されたことから証明されたとおり、ミトコンドリアを傷害から保護した。

【0066】これらの結果は、FDPでの処置は、よくある移植臓器のエキスピボ型の虚血貯蔵に付したエキスピボ貯蔵心臓の機械的および細胞内化学的狀態を有意に向上することを明らかに示している。

【0067】投与用量および投与様式

その臓器保護および拒絶抑制活性を利用するために、FDPは幾つかの方法で投与できるが、FDPは解糖プロセスにおいて活発に消費されるため、好ましい投与様式には、持続期間にわたり十分な供給が利用できる状態を確保するための連続投与がある。

【0068】一投与様式では、ドナー本体から臓器を摘出する前に、FDPをドナーへ(ボーラス注射または連続注入のいずれかにより)静脈内投与する。ドナーは、(腎臓ドナーとして)完全に生存しているコンピートな個体、即ち、致命的傷害を持っていたり、末期病状である個体および意識不明または昏睡状態である個体、または死亡したばかりでその心拍動をCRP型外部圧または電気刺激により外的に刺激しなければならない個体である。患者が実質的な血液循環を依然維持しているならば、静脈内注射または注入を用いて、摘出および移植される臓器内へFDPを導入できる。

【0069】心拍動がないならば、できるだけ迅速に臓器を体内から摘出すべきであり、その主な動脈を、その臓器の血管から適切なFDP含有液(例えば、グルコースも含有するリン酸緩衝塩水溶液)をくみ出す灌流装置につなげるべきである。所望ならば、その臓器をFDP含有液に浸して、液体から臓器組織の表面層へとFDPを浸透させてもよい。

【0070】臓器を摘出した後、臓器から体液を連続的にくみ出す灌流装置にてそれが維持されているならば、その体液は、FDPを約0.5から50mg/mlの範囲の濃度で含有すべきである。あるいは、新鮮な体液を臓器から間欠的(例えば、10分毎)にくみ出す場合、4℃で貯蔵中各時間に臓器重量kg当たり約50ないし350mgのFDPを臓器に与えるべきである。

【0071】臓器をレシピエント体内へ移植する外科手術の際、レシピエントには術中および術後数時間(例えば、術中注入にして90分またはそれ以上)、患者の麻

酔がきいている間、約10-15分の初期ボーラス、次いで約0.5から約10mg/kg/分の一定注入において時間当たり体重kg当たりFDP約50ないし350mgの投与量で連続静注によりFDPを与えるべきである。

【0072】術中期間経過後は、移植レシピエントに初期回収期間中（例えば、多くの患者の場合、約7日から10日）1日当たり体重kg当たりFDP約200ないし1500mg（好ましくは、間欠的に、例えば6時間毎に投与する）を与えるべきである。

【0073】初期回収期間経過後は、好ましくは、シクロスポリン化合物などのその他の免疫抑制剤と共に、患者に低量のFDP長期間持続投与量を与えればよい。

【0074】FDPは、また急性拒絶症状の発生に応じても投与できる。今日、このような症状の発生は、通常、ある種のステロイドなどの抗炎症剤と共に高レベルのCSAを投与することにより、この症状が鎮静するまで処置される。一時的な拒絶反応を処置するのに使用される方法の一部としてFDP投与処置を補足してもよく、また、不必要な場合もある。

【0075】

【実施例】実施例1

刺激されたTリンパ球に関するインビトロ試験
スプレーグドーリーラット（体重150-200グラム）を過量のケタミン（筋肉内注射、IM）により安楽死させた。それらの脾臓を無菌条件下で摘出し、緩衝ハンクス溶液（BHS）を入れたプラスチック製ペトリ皿中に置いた。脾臓実質組織を滅菌針およびピンセットで引き裂いた。脾臓断片含有の溶液をガラス管中でテフロン乳棒によりホモジネートした。これによって細胞を溶液中に発現させ、次いでこれを濾過し、フィコルーハイパーク上に置き、1500RPMで20分間遠心分離にかけることにより、単核細胞を分離した。細胞の中間層（リンパ球含有）を除去し、10分間1000RPMでの遠心分離にかけた。上清を除去後、残存している赤血球を0.83%NH₄Cl溶液により溶解し、細胞を再び1000RPMで2-3分間遠心分離にかけた。上清を流出させ、細胞を2回BHSで洗浄し、次いで組織培養培地（RPMI-1640、10%胎児牛血清含有）に再懸濁した。次いで、RPMI-1640および10%牛胎児血清により、細胞を最終濃度 5×10^6 細胞/mlに調節した。

【0076】組織培養マルチウェルプレートにインキュベーションに用いた。ウェル充填は全て無菌条件下で行われた。各ウェルに0.1mlの細胞懸濁液、細胞増殖阻害用に0.1mlのFDPまたはシクロスポリンA（CSA）、および0.1mlのコンカナバリンA（ConA）（10μg/ml、RPMI-1640細胞培養培地中で混合）、またはRPMI-1640のみ（対照として）を入れた。ウェル容量容積は0.35mlであった。ConAはT細胞の増殖を刺激する公知分裂促

進因子である。これらの試験は、分裂促進因子誘導T細胞刺激に対するFDPまたはCSAの効果を評価するように設計された。

【0077】6種の異なる希釈率（10%FDPストック溶液から滅菌水溶液中で新たに製造）—1:10、1:100、1:250、1:500、1:1000および1:10000を使用した。使用した4濃度のCSA（50mg/mlストック）は、0.5、5、50および500ng/mlであった。CSA、FDPおよびConAをRPMI-1640で希釈した。数個のウェルを用いて刺激指数を測定し、FDPまたはシクロスポリン含有でConAまたはRPMIを入れた。全ての組み合わせについて3回同じことを反復した。ウェルにラベルを貼り、35℃で48時間CO₂によりインキュベーションした。

【0078】次いで、各ウェルに0.05mlのトリチウム化（³H）チミジン（1μCi/0.05ml）を入れた。リンパ球を増殖することにより放射性標識チミジンを取り込ませ、それらを液体シンチレーション計数器を用いて計数した。16-20時間のインキュベーション後、多重自動式試料採取装置を用いて試料をガラス濾紙片に採取した。紙を4-5時間乾燥させた。各ウェルからの紙を、5mlフルオラン（シンチレン）と共にシンチレーション計数ガラス瓶中に入れた。各試料を2分間計数し、2分間当たりの数で結果を記録し、+または-標準誤差を13実験（FDPについて）または9実験（CSAについて）にわたって測定し、各実験には全く同じ3試料を用いた。有意性を非両側t-検定により評価した。

【0079】トリパンブルー染料排除試験を用いて、各組み合わせにおける細胞生存能力を48時間のインキュベーション後にチェックした。細胞生存能力試験の結果は表3のとおりであり、生存し得た細胞のパーセンテージを示している。

【0080】表1および2が示すところによると、これらの結果は、ラット脾臓Tリンパ球がコンカナバリンAで刺激されると、これらの細胞の増殖が用量依存的にFDPまたはシクロスポリンAの両方により阻害されたことを示している。表3が示すところによると、FDPに暴露されたリンパ球の生存能力は、CSAとインキュベーションした細胞の場合よりも高かった。FDPは、Tリンパ球形態変換を顕著に抑制はしたが、非常に高濃度の場合を除いて細胞の生存能力に顕著な損傷は加えることはなかった。対照的に、CSAは、どの試験濃度でもリンパ球生存能力を低下させた。

【0081】要約すると、これらのデータは、FDPが刺激されたTリンパ球の形態変換のインビトロ抑制においてはCSAと同程度に有効であるが、細胞の生存能力にはほとんどまたは全く損傷を加えないことを示している。

【0082】実施例2

移植心臓を用いたインビゴ試験（系列1）

雄のウィスターファースラット（WF；RT-1^u）および雄のルイスラット（Lew；RT-1^l）をハーラン・スプラーグ・ドーリー動物試験所から入手した。体重200-224グラムのルイスラットをレシピエントとして使用した。体重200-224グラムのWFラットをドナーとして使用した。

【0083】移植の1-2日前に、ケタミン（100mg/kg）およびキシロカイン（5mg/kg）の混合物の腹腔内注射（IP）によりルイスラットに麻酔をかけた。この時点で、PE-90管を内頸静脈に入れ、頸の後面を通して引き出した。ラットを個々のケージに入れることにより、カテーテルが取り除かれないようにした。水やラット食餌に対する制限は全く設けなかった。

【0084】この移植方法は、腹内移植に関するオノおよびリンゼイの微小血管技術の修正バージョンである。WFラットに対しペントバルビタール（50mg/kg）で麻酔をかけた。胸部および腹部の毛を剃り、ベタジンで準備し、次いでサーモスタットで温度制御した手術台に載せた。腹部縦切開を行い、300単位のヘパリンを下大静脈（IVC）に注射した。3分後、胸骨および前胸郭を大型の鉗で横隔膜および外側肋骨から分離した。胸腔を開き、5-0絹結紮糸を用いてIVCを結紮した。次いで、大動脈を切開し、腕頭動脈レベルのところをクランプで十字に締めた。3ccの冷心停止液（4℃）を25ゲージ針により大動脈付け根へ注射した。大動脈をクランプ下で分割した。肺動脈を固定しないで切開し、その分岐点のところで分割した。2-0絹結紮糸を心臓周囲に巻き、上大静脈および肺静脈を一まとめに結紮した。次いで、心臓を摘出し、ヘパリン（2単位/ml）を含む氷冷食塩水中に入れた。

【0085】次いで、同様の方法でルイスラットに麻酔をかけた。腹部の毛を剃り、準備した後、腹部縦切開を行った。IVCおよび腎臓下大動脈を一緒に動かせるようにした。次いで、湾曲したブルドッグを用いて管をクランプで十字に締めた。9-0エチコン顕微手術用縫糸を用いて肺動脈およびIVC間の開口部を縫合した。次に、類似した末端-側面方法で、大動脈-大動脈吻合を行った。次いで、縫糸線をアビチンにより囲み、クランプをゆっくりと除去した。心臓はピンク色になり、20-30秒で活発に収縮し始めた。次いで、腹部内容物を戻し、腹部を2-0絹縫糸で閉じた。

【0086】次に、4処置群および1対照群を設定した。実験群には、手術の15分前に350mg/kgのFDPを静脈内注射した。次いで、それらに対し、手術中10mg/kg/分の速度でFDPの90分注入を行った。この試験では、抗生物質はどの動物にも投与されなかった。

【0087】実験群には、

- 1) 手術時FDP、術後2時間で食塩水の注射、
- 2) 手術時FDP、術後2時間で注射、次いで12時間毎に注射（350mg/kg）、
- 3) 手術時FDP、術後2時間で注射、次いで8時間毎に注射（350mg/kg）、
- 4) 手術時FDP、術後2時間で注射、次いで6時間毎に注射（350mg/kg）

のいずれかを与えた。対照群には注射をしなかった。

【0088】生存能力について毎日動物を調べた。心拍が触知されないときには、ケタミン/キシロカインで麻酔し、麻酔下で評価した。移植心臓が生存し得ない場合、致死量のペントバルビタールを投与した。心臓を摘出し、10%ホルムアルデヒド中に入れた。次いで、それらを顕微鏡で調べ、スタンフォードグレード尺度を用いて拒絶に関するグレード付けをした。

【0089】術後3日までに停止した心臓がある場合、それらを技術的な問題とみなし、試験から外した。未知の症例について手術の5日以内に死んだラットもまた、試験から外した。これらの死亡は、敗血症に続発的なものであると感じられた。1匹のラットは、8日目に縫合破裂で死んだ。このラットも試験から外した。

【0090】対照群の平均生存期間（MST）は7.6日であった（表1）。これらのラットは全て、移植心臓が拒絶反応を起こすまで生きていた。それらの拒絶程度は中程度～重度/進行段階であった（表2）。

【0091】I群のMSTは13.5日であった（表1）。1匹のラットは8日目に縫合破裂で死亡し、試験から外された。第2のラットは9日目に敗血症で死んだ。この群の残りのラットは拒絶反応時まで生きており、拒絶グレードは軽度～重度/進行段階であった（表2）。敗血症で死んだラットは、ラットの不注意な処置の結果続発したものとはみなされなかった。

【0092】II群のMSTは8.9日であった（表1）。1匹のラットは敗血症で9日目に死んだ。他のラットは全て移植片拒絶反応時まで生きており、拒絶程度は軽度～重度/進行段階であった（表2）。敗血症で死亡した1匹のラットにおける移植体の場合は軽度であった。

【0093】III群のMSTは10日であった（表4）。1匹のラットは敗血症で12日目に死亡し、1匹のラットについては敗血症のために11日目の午後に殺した。2番目のラットは、殺した日の夜その移植片が強く触知され得たため、12日目に拒絶反応をおこしたものであるとして数えられた。この群の残りは拒絶反応時まで生きており、グレードは中程度～重度/進行段階であった（表5）。

【0094】IV群のMSTは9.6日であった（表4）。この群のラットは全て、移植片に拒絶反応が起こるまで生きていた。それらは全て、拒絶グレードは重度/進行段階であった（表5）。

【0095】敗血症は、この実験が直面する難しい問題であった。敗血症が二次的原因で合計4匹の実験用ラット(9.5%)が死亡するかまたは処分された。全ラットに2つの手術、すなわち内頸静脈ラインを入れる手術および移植を目的とする手術を行った。次いで、ラットに対し、連続中央カニューレ挿入および反復注射を行った。感染予防技術を使用はしたが、ラットは自分のカテーテルを噛み、自身の糞の中をころげまわった。この実験群の場合、無菌状態を確保するのは困難であった。

【0096】上記問題点にもかかわらず、この試験は、FDPがラットにおいて心臓移植生存期間を延ばすことを立証している。

【0097】実施例3

移植心臓を用いるインビボ試験(系列2) ; FDP単独およびシクロスポリンと組み合わせた場合の同種移植生存期間の増加

これらの試験で使用される外科技術は、実施例2の記載と全く同じであるが、ただし、この一連の試験における動物には術後に予防的抗生物質処置を施し、さらに静脈カテーテル部位にバシトラシン軟膏を毎日塗布した。

【0098】動物を下記6群に分けた: 1群(n=6)、すなわち対照には、FDPもCSAも与えなかった。2群(n=5)には、FDPのみを350mg/kgの術前静脈注射、および90分間10mg/kgの手術時静脈注入として投与した。3群(n=6)には、最適以下の用量のCSA(2.5mg/kg/日IM)を投与した。4群(n=5)には、最適以下で上記より高用量のCSA(5mg/kg/日IM)を投与した。5群(n=5)には、FDPを術前注射(350mg/kg IV)、90分間10mg/kg/分でのFDPの手術時注入、およびFDPの維持注射(12時間毎350mg/kg IV)として投与した。またこの群には、2.5mg/kg/日IMでCSAも投与した。6群(n=5)には、5群と同じFDP処置を施し、CSA用量を5mg/kg/日IMに増やした。

【0099】表6が示すところによると、FDPおよびCSAは両方とも、個々に同種移植生存期間を顕著に延ばした。FDP処置もCSA処置もしなかった1群(対照)では、MSTは 7.0 ± 0.25 日であった。1群において、FDPのみを与えると、MSTは 11.4 ± 0.74 日(統計的確率 $p < 0.0001$)であった。2群において、2.5mg/kg/日でCSAを投与すると、MSTは 12.0 ± 0.57 日($p < 0.0001$)であった。3群において、5mg/kg/日でCSAを投与すると、MSTは 12.4 ± 0.81 日($p < 0.0001$)であった。FDP単独で処置された群および2.5mg/kg/日または5mg/kg/日用量のCSAを投与されたラット間における同種移植生存に有意な差異はなかった。

【0100】1-4群に関するデータは、FDPが単独

でも同種移植拒絶反応の低減化にかなりの効果を有することを示している。

【0101】5および6群に関するデータは、MSTがそれぞれ17.6日および28.2日にと、かなり増加することを示している。これは、FDPおよびCSAの組み合わせが、CSAまたはFDP単独の場合と比べて同種移植生存期間を顕著に増加させることを示していた。

【0102】蓄積されたデータは、(1)FDPが単独で同種移植拒絶反応の問題を減らし、かつ同種移植生存期間を増加させ得ること、さらにまた(2)FDPがシクロスポリンの有用な免疫抑制効果を強化し得ることにより、シクロスポリンの有毒な副作用を回避または最小限にし得る方法で、使用されるシクロスポリンの用量を低減化させ得ることを示している。これらの特性は両方とも、移植片レシピエントの維持および処置に非常に有用である。

【0103】要約すると、インビボおよびインビトロの両試験において、FDPが、T細胞増殖の低減化および同種移植組織の生存期間延長において顕著な活性を呈することが示された。さらに、この新規免疫抑制剤は、同種移植拒絶反応の処置に現在使用されている他のあらゆる薬剤に固有の毒性問題を明らかに回避できる。組み合わせ療法で使用する場合、FDPは、使用されるさらに危険な他の免疫抑制剤(例えばシクロスポリン)の用量を低減化させることができる。

【0104】実施例4

臓器保管中における損傷を低減化するためのFDPの使用

ケタミン麻酔したスプラッグ・ドーリーラット(体重350-450グラム)から心臓を採取した。心臓採取前、無作為に選んだ17匹のラットにFDP450mg/kg(10%)の静脈内ボーラス注射を行った。心臓を摘出し、左心房および大動脈を3分以内に修正ランゲンドルフ装置に結合し、そして心臓を、0.07mg/mlのFDPを加えたクレブス-ヘンゼライト溶液により37℃で15分間エキスビボ(生体外)灌流した。対照群(n=21)におけるラットには、手術前に等容量の食塩水注射を行い、FDP不含有のクレブス-ヘンゼライト溶液により心臓を15分間灌流した。この期間中における心拍、収縮期圧および拡張期圧、心拍出量および冠動脈血流量を測定し、記録した。

【0105】15分の灌流期間後、対照心臓(n=21)を心停止液(アイソライト、 K^+ 20ミリ当量/L)で洗った。FDP処置した心臓(n=17)を、1mg/ccのFDPを含む同溶液で洗った。心臓をそれぞれ、0.9%NaClまたは1mg/ml FDP含有0.9%NaClを含む冷(4℃)食塩水溶液中に入れ、4℃で4時間保管した。4時間の保管期間完了後、心臓を再灌流し、再び37℃に温めた。15分後各群からの7心臓をランゲンドルフ装置から取り出し、心筋A

TP含有量について分析した。残りの心臓（処置群では10、および対照群では14）を再灌流開始後2時間様々な方法（心拍数、平均大動脈および収縮期圧、および心拍出量）で測定した。

【0106】冷却エキスピボ保管前、心拍数、平均大動脈および収縮期圧、および心拍出量について、対照および処置群間に顕著な差異はなかった。1時間30分の再灌流後、全てのFDP処置心臓（ $n=10$ ）は依然として心拍を示しているが、14の対照心臓のうち心拍を示すのは5つだけだった（ $p<0.005$ ）。保管後心拍数（図1）、ピーク収縮期大動脈圧（図2）、平均圧（図3）および心拍出量数（図4）は全て、FDP処置心臓の方が対照群の場合よりも顕著に高かった。また15分の再灌流後における心筋ATP含有量も、FDP処置心臓の方が対照群の場合よりも高かった（図5、 $p<0.01$ ）。

【0107】これらの結果は、FDPで処置すると、エキスピボ保管心臓の機械的機能が顕著に改善され、4時間のエキスピボ低（体）温虚血状態保管後における心筋レベルが高められたことを明白に示している。

【0108】実施例5

エキスピボ保管臓器におけるFDPを用いたミトコンドリア損傷に対する防御先に示したところによると、低温虚血状態保管期間の後、虚血後再灌流後に臓器の酸素利用能力は損なわれている。これは、保管およびそれに続く再灌流中における Ca^{++} によるミトコンドリア損傷および傷害性酸化性基の生成によるものである。

【0109】機械的機能および心筋ATP含有量は虚血状態保管前およびその間にFDPで処置した心臓において著しく改善されたため、16~20時間の低体温虚血状態保管後の臓器における酸素消費を評価する一連の追加実験を行った。

【0110】スプラッグ・ドーリーラット（150-180グラム/体重）に対し、ケタミン35mg/kgで麻酔をかけた。肝臓、腎臓および心臓を摘出し、4℃に予冷しておいた、商標名アイソライトで販売されている標準心停止液（ Na^{+} -41ミリ当量/L、 K^{+} -16ミリ当量/L、 Ca^{++} -5ミリ当量/L、 Mg^{++} 3ミリ当量/L、 Cl^{-} -40ミリ当量、アセテート24ミリ当量/L、5%デキストロースを含有）50ml中に入れた。保管容器の半分に1mg/mlの10%FDPを加えた。容器の残りに同様の量のグルコースを加えた。容器を冷蔵庫の中の氷上に置いた。16~20時間保管後、臓器を秤量し、クラークのポーラログラフ電極を用いる酸素消費測定用の代謝チャンバーに入れた。チャンバーの総容量は10mlであり、培地の組成は、 $36\pm0.2^{\circ}C$ の温度で8mlリン酸緩衝食塩水（PBS デュルベッコ、 Mg^{++} および Ca^{++} 不含有）および2ccのデ

キストロースであった。臓器をチャンバーに入れ、100%酸素を45秒間吹き込んだ。溶解した酸素の部分圧は、通常480-560mmHgであった。次いで、チャンバーを密封して閉じ、1cm/分の速度でストリップチャート記録装置において臓器による O_2 消費を記録した。チャンバー中における培地の開始および最終 PO_2 レベルをラジオメーター血液ガス分析計ABL-4型で測定した。

【0111】FDP処置肝臓（ $n=12$ ）に関する虚血状態保管後（ 17.62 ± 0.22 時間）の酸素消費レベルは、対照肝臓（ $n=12$ ）（ $p<0.005$ ）における 55.5 ± 4.8 のレベルと比べると、 $36.4^{\circ}C$ で $76.7\pm4.4 O_2$ mmHg/分/gであった。同様に、FDP処置腎臓（ $n=11$ ）は、対照腎臓（ $n=11$ 、 57.4 ± 4.6 mmHg O_2 /分/g、 $p<0.025$ ）よりも保管後 O_2 消費が著しく良好（ 74.1 ± 4.8 mmHg、 O_2 /分/g）であった。FDP処置心臓（ $n=4$ ）もまた、対照心臓（ $n=4$ 、 $p<0.025$ ）における 46.2 ± 6.5 と比べて、 68.4 ± 3.14 mmHg O_2 /分/gと、保管後 O_2 消費が高かった。

【0112】これらのデータは、FDPを用いて虚血状態で保管された臓器を処置すると、著しく高い保管後酸素利用による証拠として、低温虚血状態保管後の心臓の機械的機能がかなりの程度まで保たれるだけでなく、ミトコンドリアが損傷から防御されることを明らかに示している。

【0113】すなわち、FDPを用いることにより同種移植組織拒絶反応の問題を低減化する新規で有用な方法について示し、記載してきた。ある程度の実施態様を引用して説明および記載する目的でこの発明を例証したが、当業界の熟練者であれば、説明された事例の様々な修正および改変が可能であることは明白なはずである。この明細書で教示した内容から直接導かれ、この発明の精神および範囲から逸脱しない変形があれば、それらもこの発明に包含されるものとする。

【図面の簡単な説明】

【図1】 エキシピボで4時間冷塩水溶液中で貯蔵した心臓における、FDP処置により与えられる心拍動速度改善を示すグラフである。

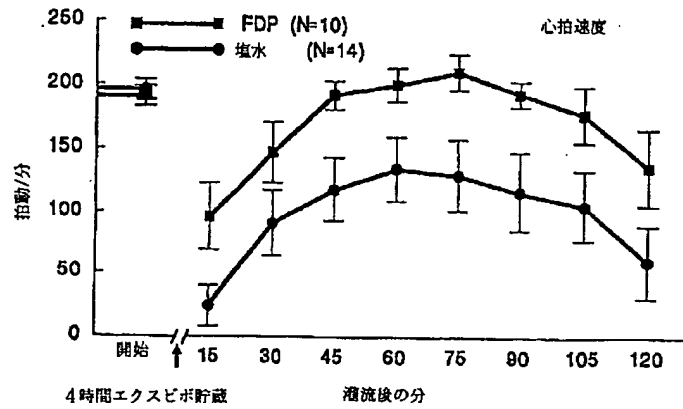
【図2】 FDP処置により与えられるピーク収縮期血圧の改善を示すグラフである。

【図3】 FDP処置により与えられる平均大動脈圧の改善を示すグラフである。

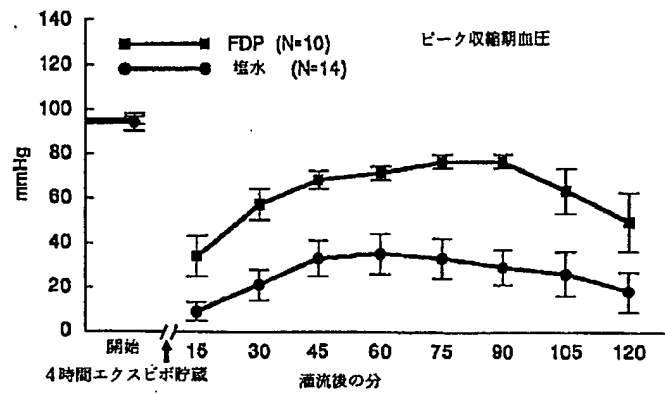
【図4】 FDP処置により与えられる心拍出量の改善を示すグラフである。

【図5】 FDP処置により与えられる心筋ATPレベルの増大を示すグラフである。

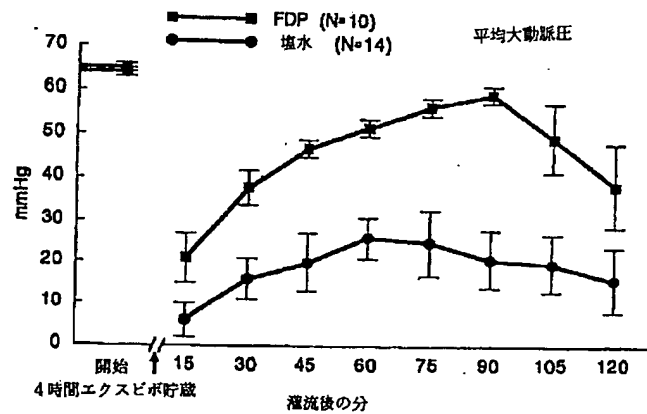
【図 1】



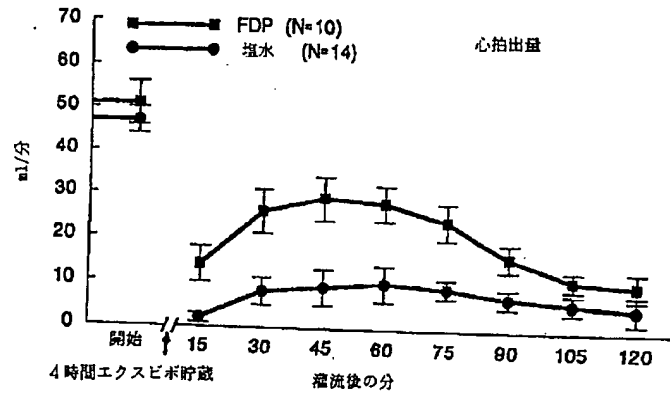
【図 2】



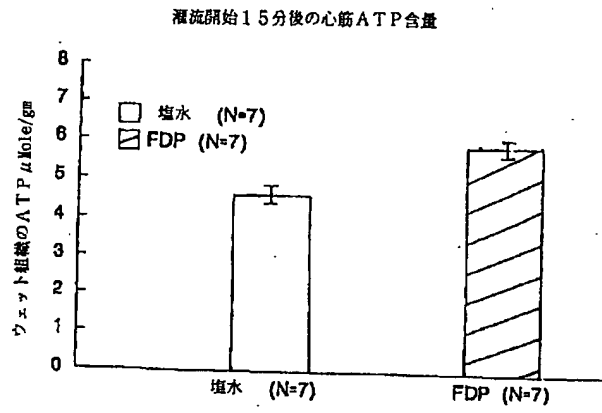
【図 3】



【図 4】



【図 5】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.